

LA BACTERIA *Azospirillum brasilense* INOCULADA EN PLANTAS DE MAÍZ SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO, PROPICIA EL AUMENTO DE TAMAÑO DEL TALLO, PESO DEL FRUTO E INDUCE CAMBIOS EN EL METABOLISMO DE AZÚCARES.

Zarazúa Arvizu E.¹; Tiessen Favier A.²; Padilla Chacón D.³; Martínez Molina C.⁴

¹Lic. en Biotecnología, Fac. de Química Universidad Autónoma de Querétaro

²Departamento de Ingeniería Genética Cinvestav-Irapuato, IPN

³Departamento de Bioquímica Fac. de Química Universidad Nacional Autónoma de México

⁴Facultad de Biología Universidad Autónoma de Guadalajara

RESUMEN

La selección de fenotipos ha mostrado buenos resultados en la obtención de mejores variedades, sin embargo, el papel de la Biotecnología tiene especial importancia ya que la utilización de la Biología Molecular ha propiciado que se logren grandes avances en la comprensión de la regulación metabólica y genética de las plantas. En este trabajo se realiza un experimento para aumentar la tolerancia a la sequía en maíz mediante la inoculación de una bacteria *Azospirillum brasilense* y se analiza la concentración de metabolitos principales. Se analizaron las diferencias fenotípicas observadas en cada planta con respecto al control y se puede observar que las plantas infectadas por la bacteria (WT y BIF) presentan en general mayor peso de tallo, peso de jilotes, longitud y % jugo con respecto a los controles ($P < 0.05$). En el análisis de la concentración de sacarosa observamos diferencias significativas entre ambos genotipos y entre las plantas inoculadas vs el control. Llama la atención que la concentración es menor en los controles, sin embargo la concentración de almidón en todas las plantas no tiene diferencias significativas. La inoculación de plantas de maíz con *A. brasilense* confiere a la planta mayor desarrollo de la planta y fruto en condiciones de estrés hídrico.

INTRODUCCIÓN

En México el consumo del maíz (*Zea mays*) ha sido desde épocas prehispánicas, pieza clave en la alimentación básica de México. El tener la capacidad de producir mayores cantidades de este grano que puedan cubrir la demanda alimenticia es indispensable para nuestra nación. La búsqueda por la obtención de mejores fenotipos y genotipos de maíz para aumentar la producción, mejoras nutricionales, calidad en el grano y planta; ha sido una gran preocupación para la comunidad científica. La selección de fenotipos ha mostrado buenos resultados en la obtención de mejores variedades, sin embargo, el papel de la Biotecnología tiene especial importancia ya que la utilización de la Biología Molecular ha propiciado que se logren grandes avances en la comprensión de la regulación metabólica y genética de las plantas. Desde que se utilizó el *Agrobacterium* para obtener plantas transgénicas (Bevan et al., 1983) se abrió un nuevo campo de exploración en plantas; esto aunado a la comprensión y la integración de los conocimientos de genómica, función de genes, buenos análisis estadísticos y la habilidad para manejar grandes cantidades de información en bases de datos, son posible lograr una mejora genética en plantas (Moose & Humm, 2008). Se han encontrado genes como los *CIPK* capaces de conferir mayor tolerancia al frío, sequía y estrés salino (Xiang et al., 2007) en granos como el arroz. En la producción de maíz transgénico se ha logrado obtener variedades de vitaminado, capaces de contener mayor cantidad de β -caroteno, ácido ascórbico y ácido fólico (Naqvi et al. 2009). El almidón juega un papel muy importante en la industria. Sin embargo es necesario

tener un conocimiento y comprensión profunda del metabolismo llevado a cabo por las plantas para lograr su mayor producción. Es bien conocido que la enzima ADP-Glc pirofosforilasa (AGPasa) es la principal enzima que interviene en el proceso de síntesis de almidón, dicha enzima es un heterotetrámero que consta de 2 subunidades grandes (AGPS, 51 kD) y 2 subunidades pequeñas AGPS, 50 kD) (Okita et al., 1990). Se ha demostrado que esta enzima es regulada por modificación redox post-traduccional (Tiessen et al. 2002) además de que se ha demostrado que ambas subunidades poseen propiedades alostéricas (Cross et al., 2004).

En este trabajo se realiza un experimento para aumentar la tolerancia a la sequía en maíz mediante la inoculación de una bacteria *Azospirillum brasilense* y se analiza la concentración de metabolitos principales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico y condiciones de desarrollo.

Se utilizaron híbridos de maíz: CML495xCML494 y 6618-1xCML495 para la siembra en invernadero. La cepa *Azospirillum brasilense* (WT) y la cepa recombinante pBBR1M::BIF (BIF) la cual contiene la sobreexpresión del gen ReOtsA que produce trealosa en exceso (Rodríguez-Salazar et al., 2009) ambas para la inoculación de las plantas de maíz. La bacteria *Azospirillum brasilense* se desarrolló en medio líquido de fluorato de níquel (NFb) (suplementado con NH_4Cl (0.2 g L^{-1}) por 2 días a 30°C y 250 rpm (Rodríguez-Salazar et al., 2009). El maíz fue sembrado en suelo estéril adicionado con vermiculita y mantenido con riego a $27\text{-}30^\circ\text{C}$ bajo condiciones de invernadero. El inóculo en la raíz de la planta de maíz se realizó a los 46 días de sembrado. Se suspendió en riego 17 días posteriores a la inoculación con la bacteria para generar el estrés por sequía y se procedió a la cosecha pasados 8 días de suspensión de riego.

Medición de metabolitos.

La medición de azúcares se llevó a cabo mediante una reacción enzimática acoplada de hexocinasa con Glucosa-6-P-deshidrogenasa. Se midió la reacción en una microplaca a 240nm. La reacción se llevó a cabo en un Buffer HEPES (100 mM HEPES) con una mezcla de reacción (NADP, ATP, G6PDH de levadura marca Roche).

Análisis de datos

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico R para determinar diferencias significativas ($P < 0.05$) entre genotipos y la bacteria inoculada.

RESULTADOS

La inoculación con *Azospirillum brasilense* genera mayor peso, longitud de caña y peso en los jilotes de ambos genotipos de semilla.

Para examinar la longitud y peso de las plantas de maíz, se procedió a cortar las plantas desde la parte superior de la raíz, se les retiraron todas las hojas y espiga; después se procedió a medir su longitud, peso de caña, jilotes y jugo extraído. En la tabla 1, se muestran los promedios obtenidos de dichas medidas. El análisis estadístico arroja diferencias significativas ($P < 0.05$) en el número de jilotes, longitud del tallo y % de jugo obtenido; entre las plantas inoculadas (WT y BIF) con respecto al control (- Bact). En los datos obtenidos de peso de tallo y peso de jugo, se observan diferencias significativas entre los genotipos utilizados y las plantas inoculadas. Sin embargo en el peso de los jilotes podemos, el análisis muestra que existen diferencias entre los 2 genotipos utilizados, las

plantas inoculadas (WT y BIF) vs control y diferencias en el tipo de bacteria utilizada para el inóculo en ambos genotipos.

Tabla 1. Promedios de las medidas obtenidas de las plantas muestreadas, los números entre paréntesis corresponden a el error estándar calculado para cada promedio obtenido.

Genotipo	Bacteria	No. De Jilotes	Longitud (cm)	Peso Jilotes (g)	Peso Cana		Peso Jugo	
					(g)	(g)	(g)	% de Jugo
CML495xCML494	WT	2.19 (0.19)	155.5 (5.29)	29.44 (5.30)	195.25 (9.09)	74.88 (3.44)	0.38 (0.00)	
CML495xCML494	Bif	2.18 (0.12)	147.3 (6.10)	20.09 (3.29)	190.64 (5.10)	75.73 (2.28)	0.40 (0.01)	
CML495xCML494	Control	1.91 (0.31)	140.37 (7.87)	14.64 (4.10)	155.37 (12.42)	49.28 (6.31)	0.32 (0.03)	
6618-1xCML495	WT	2.4 (0.16)	161.4 (5.87)	40.8 (6.65)	222.1 (10.20)	84.6 (3.81)	0.38 (0.01)	
6618-1xCML495	Bif	2.46 (0.16)	167.8 (6.39)	60.82 (7.79)	146.73 (15.29)	97.73 (7.94)	0.39 (0.01)	
6618-1xCML495	Control	1.5 (0.25)	132.7 (6.98)	19.3 (4.52)	171.7 (8.37)	64.05 (3.13)	0.37 (0.01)	

Análisis de la concentración de azúcares y aminoácidos.

Se obtuvieron muestras de 1 ml de cada extracto de jugo obtenido de las cañas cosechadas y se determinó la concentración de azúcares y aminoácidos contenidos en cada uno de ellos. Las gráficas de los resultados se muestran en la Fig.1

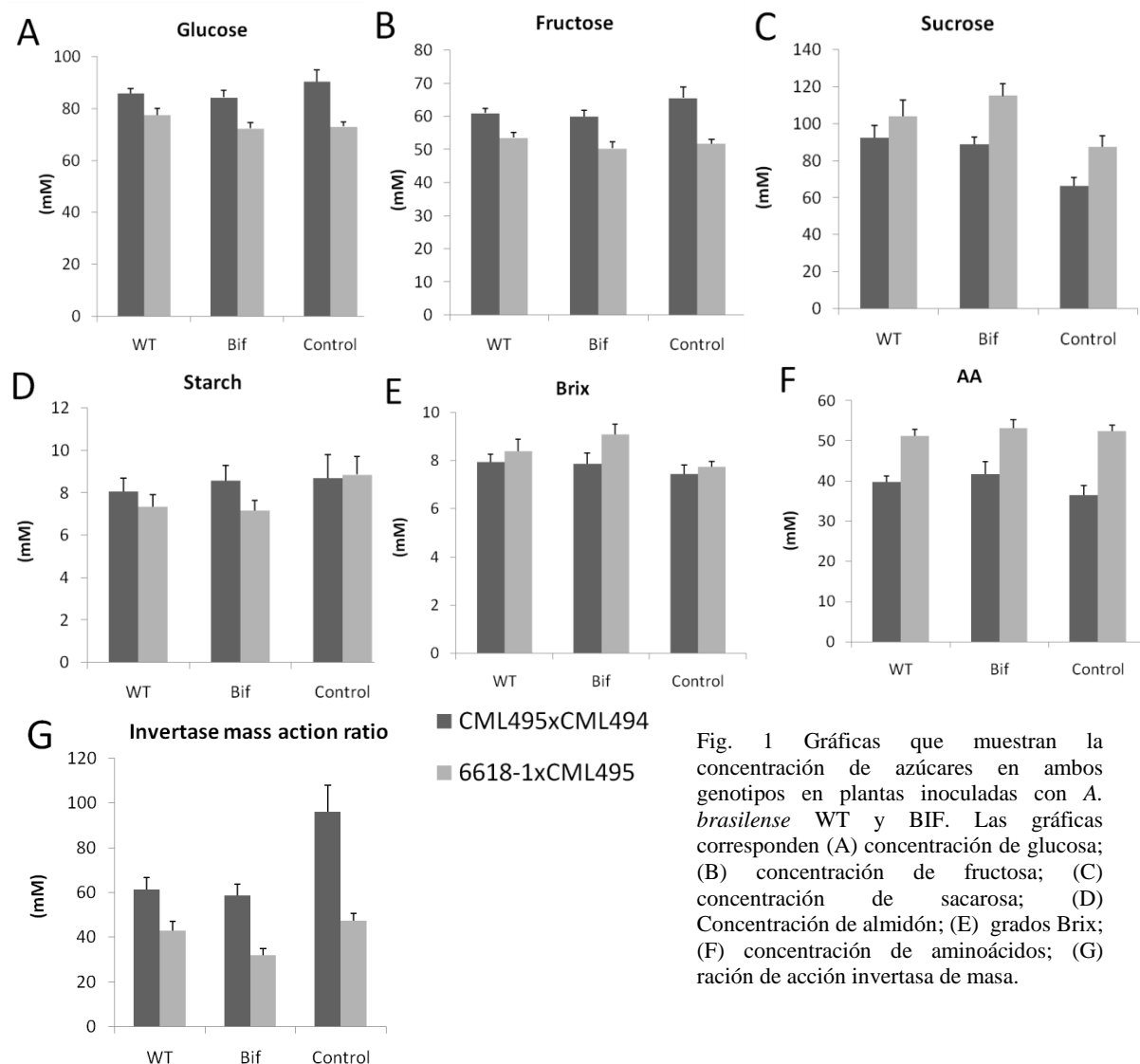


Fig. 1 Gráficas que muestran la concentración de azúcares en ambos genotipos en plantas inoculadas con *A. brasilense* WT y BIF. Las gráficas corresponden (A) concentración de glucosa; (B) concentración de fructosa; (C) concentración de sacarosa; (D) Concentración de almidón; (E) grados Brix; (F) concentración de aminoácidos; (G) ración de acción invertasa de masa.

DISCUSIÓN

El mejoramiento genético de maíz, es un campo que tiene un vasto compendio a explorar, obtención de semillas con fenotipos más resistentes a estrés osmótico e hídrico; la obtención de maíz vitaminado, entre otras; ha captado el interés de los investigadores orientados a líneas de investigación que llevan este tenor. En este experimento se produjeron bacterias transgénicas de *A. brasilense* con la capacidad de sobreproducir trealosa y se inocularon en dos híbridos de maíz para conferirles la tolerancia al estrés de sequía. Se analizaron las diferencias fenotípicas observadas en cada planta con respecto al control y se puede observar que las plantas infectadas por la bacteria (WT y BIF) presentan en general mayor peso de tallo, peso de jilotes, longitud y % jugo con respecto a los controles ($P < 0.05$). Estos datos nos muestran que la bacteria actúa en simbiosis con la planta proporcionándole mayor capacidad de crecimiento como ya antes se había demostrado (Caballero-Mellado et al., (1992), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre la bacteria WT y BIF, estos datos señalan que la acumulación de trealosa en la planta no modifica su desarrollo en gran proporción en condiciones de estrés hídrico. Sin embargo, el análisis de azúcares obtenido, nos proporciona un panorama general de los cambios metabólicos que ocurren en la planta en condiciones de estrés hídrico en presencia de trealosa en exceso. En la concentración de glucosa, fructosa y aminoácidos encontrada en las plantas, no se observan diferencias significativas entre las plantas inoculadas y el control, sin embargo si se observan diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los genotipos analizados, teniendo el genotipo CML495xCML494 mayor cantidad de glucosa y sacarosa y el genotipo 6618-1xCML495 presenta mayor concentración de aminoácidos con respecto al otro. Probablemente debido a las diferencias propias de cada genotipo. En la concentración de sólidos disueltos (°Brix) sólo se observan diferencias significativas entre la planta inoculada con BIF vs control en el genotipo 6618-1xCML495. En el análisis de la concentración de sacarosa observamos diferencias significativas entre ambos genotipos y entre las plantas inoculadas vs el control. Llama la atención que la concentración es menor en los controles, sin embargo la concentración de almidón en todas las plantas no tiene diferencias significativas. Probablemente la bacteria no interfiera en la actividad de la enzima AGPasa, esencial en el metabolismo de almidón, dados los resultados. Sin embargo los cambios en la concentración de sacarosa pueden mostrar que los azúcares están siendo conducidos por otras vías. Se observa también que la razón de la acción invertasa de masa es significativamente diferente en ambos genotipos, y tipo de bacteria inoculada siendo mayor en los controles en ambos casos.

CONCLUSIONES

La inoculación de plantas de maíz con *A. brasilense* confiere a la planta mayor desarrollo de la planta y fruto en condiciones de estrés hídrico. Sin embargo la sobreexpresión del gen de trealosa no parece tener mayor impacto genotípico. Sin embargo al analizar algunos metabolitos podemos observar ciertas diferencias en la concentración de sacarosa. Para comprender a profundidad la razón de esos cambios es necesario realizar experimentos enfocados a despejar esta duda.

REFERENCIAS

Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (2006) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature 304: 184-187.

Caballero-Mellado J, Carcaño-Montiel MG & Mascarúa-Esparza MA (1992) Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. Symbiosis 13: 243-253.

Cross J, Clancy M, Shaw J, Greene T, Schmidt R, Okita T and Hannah L (2004) Both Subunits of ADP-Glucose Pyrophosphorylase Are Regulatory. Plant Physiology, 135: 137–144

Moose SP, Mumm RH (2008) Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement Plant Physiology, 147: 969-977.

Naqvi S, Zhu C, Farre G, Ramessar K, Bassie L, Breitenbach J, Pérez D, Ros G, Sandmann G, Capell T and Cristou P (2009) Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. PNAS.

Okita TW, Nakata PA, Anderson JM, Sowokinos J, Morell M, Preiss J (1990) The subunit structure of potato tuber ADPglucose pyrophosphorylase. Plant Physiol 93: 785–790

Rodríguez-Salazar J, Suárez R, Caballero-Mellado J & Iturriaga G (2009) Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. FEMS 1614: 1-8

Tiessen A, Hendriks J, Stitt M, Branscheid A, Gibon Y, Farré E and Peter Geigenberger (2002) Starch Synthesis in Potato Tubers Is Regulated by Post-Translational Redox Modification of ADP-Glucose Pyrophosphorylase: A Novel Regulatory Mechanism Linking Starch Synthesis to the Sucrose Supply. The Plant Cell, 14: 2191–2213

Xiang Y, Huang Y and Xiong L (2007) Characterization of Stress-responsive *CPIK* genes in rice for stress tolerance improvement. Plant Physiology, 144: 1416–1428.